

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-143078
(43)Date of publication of application : 03.06.1997

(51)Int.Cl. A61K 31/725
A61K 31/725
A61K 7/00
C08B 37/08
// C12N 1/20
C12P 19/26
(C12N 1/20
C12R 1:46)
(C12P 19/26
C12R 1:46)

(21)Application number : 08-273821 (71)Applicant : BIO TECHNOL GENERAL CORP
(22)Date of filing : 16.10.1996 (72)Inventor : NIMROD ABRAHAM
GREENMAN BENJAMIN
KANNER DOV
LANDSBERG MOSHE

(30)Priority

Priority number : 85 692692 Priority date : 18.01.1985 Priority country : US
86 815957 09.01.1986 US

(54) HIGH MOLECULAR WEIGHT SODIUM HYALURONATE COMPOSITION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a nonpyrogenic and noninflammatory high molecular weight sodium hyaluronate composition.

SOLUTION: This high molecular weight sodium hyaluronate composition contains about 88-92wt.% sodium hyaluronate and 8-12wt.% water, has nonpyrogenic and noninflammatory activities and contains no protein derived from animals. The sodium hyaluronate is produced by *Streptococcus zooepidemicus*, has at least 3.5m3/kg intrinsic viscosity, a ratio of glucuronic acid/N-acetylglucosamine = 1/1, about 4-6% sodium ion and about 155-165 specific angle of rotation measured at 436nm wavelength and contains <0.01wt.% protein, <0.001wt.% sulfate, <0.02wt.% neutral sugar, <0.05ng/ml endotoxin, <2mg/g iron and <0.2mg/g copper.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.10.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3081544

[Date of registration] 23.06.2000

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right] 16.01.2006

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-143078

(43)公開日 平成9年(1997)6月3日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/725	A B E		A 6 1 K 31/725	A B E
	A B L			A B L
7/00			7/00	J
C 0 8 B 37/08			C 0 8 B 37/08	Z
// C 1 2 N 1/20			C 1 2 N 1/20	E

審査請求 有 発明の数2 O L (全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-273821
(62)分割の表示 特願昭61-500791の分割
(22)出願日 昭和61年(1986)1月16日

(31)優先権主張番号 6 9 2 6 9 2
(32)優先日 1985年1月18日
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 8 1 5 9 5 7
(32)優先日 1986年1月9日
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 594112118
バイオ-テクノロジー・ジェネラル・コーポレイション
アメリカ合衆国、ニューヨーク・ヨーク・10152、
ニューヨーク、パーク・アヴェニュー・
375
(72)発明者 アブラハム・ニムロッド
イスラエル国、レホヴォット、アイゼンバ
ーグ・ストリート・8
(72)発明者 ベンジャミン・グリーンマン
イスラエル国、レホヴォット、ハーダー・
ストリート・6
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外1名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高分子量ヒアルロン酸ナトリウム組成物

(57)【要約】

【課題】 非発熱性及び非炎症性の高分子量ヒアルロン酸ナトリウム組成物の提供。

【解決手段】 ヒアルロン酸ナトリウム約88~92重量%と水8~12重量%を含み、発熱性及び炎症活性がなく、動物由来の蛋白質を含まない組成物であって、ヒアルロン酸ナトリウムがStreptococcus zooepidemicusによって產生されるものであり、少なくとも3.5m³/kgの極限粘度を有し、グルクロン酸対N-アセチルグルコサミンの比が1:1であり、ナトリウムイオンが約4~約6%、25°C、波長436nmで測定した比旋光度が約155~約165°、蛋白質が0.01重量%未満、硫酸塩が0.001重量%未満、中性糖が0.02重量%未満、内毒素0.05ng/ml未満、鉄が0.2mg/g未満、銅が0.2mg/g未満であることを特徴とする組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸ナトリウム約88～92重量%と水 8～12重量%を含み、発熱性及び炎症活性がなく、動物由来の蛋白質を含まない組成物であって、ヒアルロン酸ナトリウムが*Streptococcus zooepidemicus*によって產生されるものであり、少なくとも $3.5 \text{m}^3 / \text{kg}$ の極限粘度を有し、グルクロン酸対N-アセチルグルコサミンの比が1：1であり、ナトリウムイオンが約4～約6%、25°C、波長436nmで測定した比旋光度が約155～約165°、蛋白質が0.01重量%未満、硫酸塩が0.001重量%未満、中性糖が0.02重量%未満、内毒素0.05ng/ml未満、鉄が0.2mg/g未満、銅が0.2mg/g未満であることを特徴とする組成物。

【請求項2】 ヒアルロン酸ナトリウム約88～92重量%と水 8～12重量%を含み、発熱性及び炎症活性がなく、動物由来の蛋白質を含まない組成物であって、ヒアルロン酸ナトリウムが*Streptococcus zooepidemicus*によって產生されるものであり、少なくとも $3.5 \text{m}^3 / \text{kg}$ の極限粘度を有し、グルクロン酸対N-アセチルグルコサミンの比が1：1であり、ナトリウムイオンが約4～約6%、25°C、波長436nmで測定した比旋光度が約155～約165°、蛋白質が0.01重量%未満、硫酸塩が0.001重量%未満、中性糖が0.02重量%未満、内毒素0.05ng/ml未満、鉄が0.2mg/g未満、銅が0.2mg/g未満であることを特徴とする組成物を、好適なキャリヤーに溶解して含む医薬用途に適切な溶液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、連鎖球菌(*Streptococcus*)属の微生物の発酵により得られる高分子量ヒアルロン酸ナトリウム組成物に係る。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】ヒアルロン酸は、50000～13000000ドルトンの分子量の線状高分子から構成される天然に存在するグリコサミノグリカンである。ヒアルロン酸は、交互に1-3及び1-4の結合により結合されたグルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンの繰り返し単位から形成される多糖である。

【0003】ヒアルロン酸は、皮膚や軟骨のような動物の種々の結合組織中に存在している。臍帯、滑液、硝子体液及びニワトリのトサカのような特定の器官は、ヒアルロン酸を特に多量に含有している。更に、ヒアルロン酸はA型及びC型連鎖球菌のような種々の微生物により产生される。

【0004】皮膚及び軟骨中におけるヒアルロン酸の役割は、水分を結合させ、組織の張度及び弾性を保持することにある。関節液中において粘性のヒアルロン酸溶液は、細胞に保護環境を与える潤滑剤として機能する。ニワトリのトサカから抽出した超純粹ヒアルロン酸溶液は、例えばE.A. Balazs名義の米国特許第4141973号

(1979年)に開示されているように、数年来眼科手術用の支持媒体として使用されている。同様の製剤が競争馬の膝関節炎症の治療に有効であるとして報告されている。ヒアルロン酸の別の用途はその親水性の高さを利用するものであり、例えばE. Balazs名義の米国特許第4303676号(1981年)に開示されているように、化粧品用としてモイスチャーローションの理想的な成分を構成する。

【0005】ヒアルロン酸は、上述のように微生物培養液を含む各種の生物ソースから単離されている。ヒアルロン酸の単離及び特徴付けについては、Meyer他, J. Biol. Chem. 107, 629(1934)、J. Biol. Chem. 114, 689(1936)に記載されており、最近ではMethods in Enzymol. 2, 8, 73(1972)中で考察されている。ヒアルロン酸の構造は、Weissman他, J. Am. Chem. Soc. 76, 1753(1954)及びMeyer, Fed. Proc. 17, 1075(1958)により解明されている。

【0006】連鎖球菌によるヒアルロン酸の製造は、Forrect他, J. Biol. Chem. 118, 61(1937)により最初に示され、その後、多くの研究者によってさらに研究されており、例えばRoseman他, J. Biol. Chem. 203, 213(1953)、Pierce and White, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 50(1954)、G.H. Warrenの米国特許第2975104号(1961)及びSunghara他, J. Biol. Chem. 254, 6252(1979)が、動物及び微生物ソースに由来するヒアルロン酸を示している。A型連鎖球菌のバッチ式発酵及びヒアルロン酸の単離に関する小規模から中規模の方法については、Thonard他, J. Biol. Chem. 239, 726(1964)、Holmstrom and Ricica, Appl. Microbiol. 15, 1409(1967)、Kjems and Lebech, Acta Path. Microbiol. Scand. 84, 162(1976)中に発表されている。これらの方法には病原性細菌の嫌気的発酵が含まれており、70000以下の中分子量のヒアルロン酸が0.4～1g/lの収率で製造されている。

【0007】別の方針としては、1983年4月4日付で公開された発明者Akasaka H他による日本特許公開第58-056692号に開示されているように、ヒアルロン酸を製造するために連鎖球菌の好気的発酵を使用する方法がある。その他の刊行物として、E.A. Balazs名義の1979年2月27日付米国特許第4141973号は、動物結合組織のようなソースからヒアルロン酸を製造及び精製する方法について記載している。しかしながら、従来技術中に開示されているヒアルロン酸の製造及び精製方法では、 2.0×10^6 ドルトンを越える平均分子量のヒアルロン酸を製造することができない。これは主に、ヒアルロン酸が剪断により分解し易いことあるいはヒアルロン酸組成中に存在している不純物又は金属イオンによる触媒反応で酸化し易いという事実に起因している。

【0008】

【課題を解決するための手段】本明細書中に記載する新規方法は、嫌気的発酵の場合約2kg/mg、好気的発酵の

場合約4~6 kg/mgの收率で約 1×10^6 ~約 4.0×10^6 ドルトンの分子量のヒアルロン酸を製造することができる。これは、ヒアルロン酸の高度な產生者であり且つ溶血素マイナス即ち病原性の殆どないC型*Streptococcus zooepidemicus*, HA-116, ATCC39920の突然変異株を製造することにより可能になった。*S. zooepidemicus*, HA-116, ATCC39920の好気的発酵及びそれに続くヒアルロン酸塩の精製の結果、 3.5×10^6 ドルトンを越える平均分子量を有するヒアルロン酸ナトリウムのバッチが得られた。本発明は、このような高分子量のヒアルロン酸ナトリウムを細菌発酵により製造及び精製した最初の方法である。

【0009】本発明の方法を使用することにより、非発熱性及び非刺激性のヒアルロン酸が得られる。本発明の範囲内の別の方法を使用すると、臨床用に好適な超純粹非炎症性ヒアルロン酸を製造することができる。

【0010】本発明は、*Streptococcus zooepidemicus*種、HA-116, ATCC39920の微生物、及び該微生物に由来し、発酵によりヒアルロン酸ナトリウムを产生して周囲培地中にこれを分泌することの可能な突然変異体に係る。

【0011】本発明はまた、好適な栄養培地中で好適な条件下で連鎖球菌属微生物を強い攪拌下に増殖させることから成るヒアルロン酸ナトリウムの獲得方法に係る。培地は、炭素源として約0.2~10 kg/mgの実質的に一定濃度の糖成分を含んでおり、約6.5~7.5の範囲の実質的に一定のpHを有しており、更に0.05 kg/mgを越える実質的に一定のマグネシウムイオン濃度を有している。微生物はヒアルロン酸ナトリウムを产生し、培地中にこれを分泌する。ヒアルロン酸ナトリウムはその後、培地から回収される。

【0012】ヒアルロン酸ナトリウムは、微生物及び培地中の不溶性の他の物質を除去するべく微生物を含んでいる培地を処理する段階と、例えば有機溶媒により培地からヒアルロン酸ナトリウムを沈降させる段階と、沈降物を回収する段階とから成る方法により培地から回収される。次に沈降物は粉碎及び乾燥され得る。以上的方法により、発熱性及び炎症性のないことを特徴とするヒアルロン酸ナトリウム組成物を製造することができる。

【0013】本発明はまた、大量のヒアルロン酸を产生し且つ溶血活性をもたない微生物を選択するための方法に係る。該方法は、突然変異体を形成するべくヒアルロン酸产生微生物を好適な突然変異誘発物質で処理する段階と、好適な固形培地上で突然変異体を増殖させる段階とを含んでいる。ムコイドコロニーを同定し、回収する。回収したコロニーを血液寒天培地上で増殖させ、ヘモグロビンを溶解させないコロニーを選択する。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明は、連鎖球菌属の微生物、例えば*S. zooepidemicus*又は*S. equisimilis*から高分子

量のヒアルロン酸ナトリウムを獲得する方法に係る。該方法は、好適な条件下で好適な栄養培地中で連鎖球菌属の微生物を強い攪拌下に増殖させる段階を含んでいる。培地は、炭素源として約0.2~10 g/lの実質的に一定濃度の糖成分を含んでおり、約0.05 g/lを越える実質的に一定のマグネシウムイオン濃度を有しており、約6.5~7.5の実質的に一定のpHを有している。微生物は、ヒアルロン酸ナトリウムを产生しこれを培地中に分泌する。ヒアルロン酸ナトリウムはその後、培地から回収される。

【0015】本発明の実施にあたっては、ヒアルロン酸を产生する任意の連鎖球菌種を使用することができ、例えば*S. zooepidemicus*、*S. equisimilis*又は*S. pyogenes*を使用することができる。好適な種は*S. zooepidemicus*であり、その菌株としては、大量のヒアルロン酸を产生する微生物を獲得するために本発明の方法に従って製造される突然変異株である*S. zooepidemicus* HA-116 ATCC39920が挙げられる。

【0016】ヒアルロン酸ナトリウムは、好気性又は嫌気性条件下で連鎖球菌を増殖させることにより得られる。本発明の一好適具体例において好適な増殖条件は、毎分培地容量当たり空気約0.5容量(vvm)を越える速度で培地を曝気することを含む。一般には1~2vvmの曝気速度が使用されるが、曝気速度は高いほうが望ましい。この好適具体例において、好適な栄養培地は1 l当たり約10~30 gのカゼイン加水分解物と、約5~15 gの酵母エキスと、約2gのNaClと、約0.5gを越えるMgSO₄·7H₂Oと、約2.5 gのK₂HPO₄と、約2~15 gのグルコースとを含んでいる。

【0017】ヒアルロン酸ナトリウムは、例えば沪過又は遠心分離により微生物及び培地中の不溶性の他の物質を除去するべく微生物を含んでいる培地を処理することにより回収され得る。次にヒアルロン酸ナトリウムは培地から沈降及び回収される。沈降物はその後均等な寸法の粒子に粉碎及び乾燥され得る。

【0018】本発明の一具体例においてヒアルロン酸ナトリウムは、微生物を含んでいる培地のpHを約5.0のpHに調整し、次に好適な時間約80°C~95°Cの温度に培地を加熱し、例えば20分間約90°Cの温度に加熱するか又は好ましくは40分間80°Cに加熱することにより回収される。加熱後、微生物及び他の不溶性物質を除去する。好適な除去方法は、ケイソウ土のような沪過助剤を使用した沪過により行なうものである。

【0019】イソプロパノールのような第1の有機溶媒を培地に加えることにより、培地又は沪液からヒアルロン酸ナトリウムを沈降させることができる。沈降物を3%水性酢酸ナトリウムに再溶解させ、次いでエタノールのような第2の有機溶媒で沈降させる。第2の沈降物を3%水性酢酸ナトリウムに再溶解させ、活性炭を加えて懸濁液を形成する。懸濁液を沪過し、例えばアセトンの

ような第3の有機溶媒を加えてヒアルロン酸ナトリウムの沈降物を形成する。第1、第2及び第3の有機溶媒は、夫タイソプロパノール、エタノール又はアセトンであり得る。あるいは各段階で同一の有機溶媒を使用することによりヒアルロン酸塩を沈降させてもよく、例えば3つの沈降段階のいずれにおいてもイソプロパノールを使用することにより培地からヒアルロン酸ナトリウムを沈降させてもよい。

【0020】本発明の別の具体例では、微生物を除去するために培地を処理する段階に先立ち、微生物を含んでいる培地のpHを約7.0に調整し、培地を約4°C~15°C、好ましくは約4°C~20°Cの温度に冷却する。次に、3%水性酢酸ナトリウムを使用して、その後の処理を可能とするのに必要な程度、例えば3倍~4倍に培地を希釈する。

【0021】本発明の一具体例では、ヒアルロン酸ナトリウム沈降物を0.15M水性NaClに再溶解させ、塩化セチルピリジニウムを添加してヒアルロン酸のセチルピリジニウム塩を形成する。セチルピリジニウム塩を水性NaCl及び15%エタノール、例えば少なくとも1MのNaClに溶解させ、例えばヒアルロン酸ナトリウムを沈降させるエタノールのような有機溶媒を添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを回収する。

【0022】このヒアルロン酸ナトリウム沈降物を0.15M水性NaCl中に再溶解させればよい。塩化セチルピリジニウムを添加して再びヒアルロン酸のセチルピリジニウム塩を形成する。ヒアルロン酸塩をNaCl(少なくとも約1M)及びエタノールに溶解させ、有機溶媒を添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを回収する。その後沈降物を無菌水性1M NaClに溶解させ、得られた溶液をケイ酸マグネシウム吸着剤、例えばフロリジルと接触させ、不純物及び残留セチルピリジニウムイオンを除去する。次に溶液を滅菌し、無菌有機溶媒例えば無菌イソプロパノールを添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを沈降させる。こうして製造されたヒアルロン酸ナトリウムを、無菌条件下で空気乾燥すればよい。

【0023】本発明の別の具体例では、発酵及び加熱段階以後で且つ微生物除去段階以前の培地を第1の有機溶媒で処理する。こうして沈降したヒアルロン酸ナトリウムを回収し、3%水性酢酸ナトリウムに再溶解させ、次に活性炭を加えて懸濁液を形成する。懸濁液をケイソウ土のような沪過助剤を使用して沪過し、有機溶媒を加えてヒアルロン酸ナトリウムの沈降物を形成する。この沈降物をその後粉碎及び乾燥する。

【0024】本発明の別の具体例では、培地の処理に先立ち、微生物を含んでいる培地のpHを約7.0に調整し、培地を約4°C~20°Cの温度に冷却する。

【0025】本発明の一好適具体例では、微生物を含んでいる培地にエタノールのような有機溶媒を加え、更に有機溶媒を使用して沈降物を収集し完全に洗浄する。ヒ

アルロン酸ナトリウム沈降物を0.15M水性NaClに再溶解させ、活性炭を加える。得られた懸濁液をケイソウ土沪過助剤を使用して沪過し、活性炭、微生物及び他の不溶性物質を除去する。次に清澄な沪液を塩化セチルピリジニウムで処理し、不溶性のヒアルロン酸のセチルピリジニウム塩を形成する。セチルピリジニウム塩を収集し、10%(v/v)エタノールを含有する水性NaCl、例えば少なくとも1MのNaClに溶解させ、例えばエタノールのような有機溶媒を添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを回収する。

【0026】このヒアルロン酸ナトリウムを0.15M水性NaClに再溶解させればよい。塩化セチルピリジニウムを添加して再びヒアルロン酸のセチルピリジニウム塩を形成する。10%エタノールを含むNaCl(少なくとも約1M)にヒアルロン酸塩を溶解させ、有機溶媒を添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを回収する。その後、無菌水性1M NaCl中に沈降物を溶解させ、得られた溶液を例えばフロリジルのようなケイ酸マグネシウム吸着剤と接触させて不純物及び残留セチルピリジニウムイオンを除去する。次に溶液を沪過滅菌し、無菌エタノールのような無菌有機溶媒を添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを沈降させる。こうして製造されたヒアルロン酸ナトリウムを無菌条件下で空気乾燥すればよい。

【0027】このヒアルロン酸ナトリウムは、化粧品グレード及び臨床用グレードのヒアルロン酸ナトリウム組成物中で、あるいは他の好適なキャリヤー、例えばグリセロール、ポリプロピレングリコール、ソルビトール、コラーゲン、ポリエチレングリコールと共に使用するのに適している。

【0028】本発明の方法により製造される化粧品グレードのヒアルロン酸ナトリウム組成物は、皮膚に刺激を与えないことを特徴とする。該組成物は、分子量が約70000~1500000ドルトンの範囲であり且つグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとの比が1:1であるようなヒアルロン酸ナトリウムを約87%~91%含有しており、更に約8~約12重量%の水と、約4~約5重量%のナトリウムイオンと、約0.1重量%未満のタンパク質と、約0.05重量%未満の硫酸塩と、約0.5重量%未満の核酸とを含有している。

【0029】本発明の臨床用グレードのヒアルロン酸ナトリウム組成物は、発熱性及び炎症性をもたないことを特徴とする。該組成物は、平均分子量が約2~3.5×10⁶ドルトンであり且つグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとの比が1:1であるようなヒアルロン酸ナトリウムを約88~約92重量%含有しており、更に約8~約12重量%の水と、約4~約6重量%のナトリウムイオンと、約0.01重量%未満のタンパク質と、約0.001重量%未満の硫酸塩と、約0.02重量%未満の核酸と、約0.2重量%未満の中性糖とを含有している。

【0030】本発明の方法により製造される好適な超純

純ヒアルロン酸ナトリウム組成物は、最小限界粘度約3.5m³/kg、最小平均分子量約3.5×10⁶ドルトンであり、25°C及び波長436nmで測定した比旋光度が約155°～165°であり、タンパク質含有量が約1mg/gであり、波長257nmの吸光度が約0.5未満であり、内毒素含有量が約0.05ng/ml未満、鉄含有量約0.2mg/g、銅含有量約0.02mg/g未満であり、生理的緩衝液中に溶解した1%組成物溶液1gをフクロウザルの硝子体液の約2分の1と置換するように注入した場合、このフクロウザルの眼の水性体液mm³当たり約200個未満の白血球が浸透することを特徴とする。

【0031】3.5×10⁶ドルトンを越える平均分子量と各種の純度グレードとを有する高分子量ヒアルロン酸ナトリウム組成物もまた、本発明の方法により製造された。

【0032】フクロウザルの眼の硝子体試験は、本質的にE.A.Balazsの米国特許第4141973号(1979年)の記載に従って実施した。

【0033】本発明は更に、微生物*Streptococcus zooepidemicus* HA-116 ATCC No. 39920又はこれに由来する突然変異体に係る。該微生物は、大量のヒアルロン酸ナトリウムを產生し且つ溶血活性をもたない微生物を選択する方法により得られた。該方法は、連鎖球菌属の微生物のようなヒアルロン酸产生微生物を、例えばニトロソグアニジンのような生物の突然変異体を產生することの可能な好適な突然変異誘発物質と接触させることから成る。例えばTodd-Hewitt寒天培地のような好適な固体培地上で突然変異体を増殖させ、ムコイドコロニーを同定する。これらのコロニーを固体培地から回収し、血液寒天培地上で増殖させる。次にヘモグロビンを溶解させないコロニーを選択し、本発明の方法に従ってヒアルロン酸を製造するために使用する。

【0034】

【実施例】

細菌選択及び突然変異

ニトロソグアニジン突然変異誘発

連鎖球菌属の細菌をトリス-マレイン酸緩衝液pH6.0中の100mg/mlのN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで40分間処理し、高度產生体を選択するためのTodd-Hewitt寒天プレート又は溶血素マイナス選択用の血液寒天プレート上で分離させた。細菌の生存率は一般に約0.1%であった。病院収蔵試料から得た各種のC型連鎖球菌を前記のように処理した。

【0035】高度產生生物質の選択

クローニングの視覚評価により、大きなムコイドコロニーを選択した。このようなコロニーの一例は、C型*Streptococcus equisimilis*の変異体(HA-100と呼称)としてイスラエル保健省の国立連鎖球菌リファレンスセンターにより分類されている菌株の単離体から得られた。連鎖球菌株の同定に用いる“API 20 Strep”試験(フランスAP

I SYSTEM社)に基づくその後の試験の結果、HA-100は*S. zooepidemicus*と密接に関連していることがわかった。

【0036】溶血素マイナス突然変異体の選択

菌株HA-100を上記の突然変異誘発手順で処理し、溶血素マイナス[hem.(-)]コロニーについて、溶血素活性及び試験管発酵におけるヒアルロン酸生成を試験した。ヒアルロン酸の高度產生者でありhem.(-)である突然変異体を一つ選択し、大規模ヒアルロン酸製造に使用した。この突然変異体をHA-116と呼称した。“API 20 Strep”試験の結果、HA-116は*S. zooepidemicus* HA-116は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約の規定に従って12301 Parklawn Drive, Rockville, Md 20852に所在のAmerican Type Culture Collectionに寄託されており、寄託番号ATCC 39920を付与されている。

【0037】発酵プロセス

選択された突然変異体HA-116の使用に加えて、発明者は細菌発酵により製造されるヒアルロン酸の収率及び分子量を増加させると共に発酵時間を短縮するための他の幾つかの独自の方法を発明した。この発明は、(I)マグネシウムイオン濃度を高レベルに維持すること、及び(II)高い曝気速度で強い搅拌下に好気性発酵を実施することを含んでいる。

【0038】本発明の一好適具体例において、発酵培地の組成は以下の通りである。

【0039】

【表1】

成 分	濃度(g/l)
カゼイン加水分解物	2.0
酵母エキス	1.0
NaCl	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5
K ₂ HPO ₄	2.5
グルコース	5

【0040】本発明のより好適な一具体例において、発酵培地中のMgSO₄ · 7H₂Oの濃度は1.0g/lであり、グルコースの濃度は10g/lであり、他の成分の濃度は上記の通りである。

【0041】培地のpHはpHコントローラの必要に応じて5N NaOHを連続的に添加することにより約7.0に維持する。等量の50%(w/v)グルコースの同時添加は、コントローラに並列に接続されたポンプにより実施する。

【0042】細菌の培養は曝気下に行っても非曝気下に行ってもよい。いずれの場合も強い搅拌下で培養することが好ましい。曝気は毎分培地容量当たり空気約1～2容量の速度で実施することが好ましい。非曝気下の発酵器の収率は、約1.5～2×10⁶の平均M.Wでヒアルロン酸約2～3g/lであった。曝気下発酵の収率は、約2.2

~ 3.3×10^6 の平均M.Wでヒアルロン酸約4~6 g/lであった。平均M.Wは、当業者に既知の粘度測定に基づいて決定した。どちらの場合も、660nmで測定したO.D.単位が2.0~2.5まで増殖した5%(w/v)細菌接種材料を使用した時、インキュベーション時間は約12時間とした。発酵の終了時に、生物集団の密度はO.D.単位8~13の濁度に相当した。

【0043】ヒアルロン酸の単離及び精製

ヒアルロン酸は3種類の異なる手順I、II及びIIIにより精製され得る。

【0044】精製手順I

精製手順IはA及びBの2段階に分けることができる。段階Aでは「化粧品グレード」のヒアルロン酸ナトリウムを生成し、段階Bでは段階Aで得られた化粧品グレードを更に精製し、臨床用に好適な高純度の非炎症性材料を生成する。

【0045】段階A

この段階は、細菌及び他の不溶性物質を沪過により除去し、その後、イソプロパノールで3回連続的に沈降させ、活性炭で処理することから成る。

【0046】化粧品グレードのみの材料が生成されたら、沪過する前に温度約90°C及びpH約5.0で発酵培養液を20分間加熱する。この時、希釀は不要である。臨床用グレードの高分子量材料を生成するためには、発酵培養液を約10°C~約15°Cの温度に氷冷し、3%酢酸ナトリウムで3倍~4倍に希釀し、pHを約7.0に調整し、その後沪過する。真空式又は圧力式沪過器と、ケイソウ土型の沪過助剤、例えばオハイオ州、シンシナチー、Eagle-Picker IndustriesのCelatom FW-14を0.5 g/l使用する。1容量のイソプロパノールを添加することにより沪液からヒアルロン酸ナトリウムを沈降させる。沈降物を等量の3%酢酸ナトリウムに再溶解させ、材料を再びイソプロパノールで沈降させる。第2の沈降物を3%酢酸ナトリウムに再溶解させ、次に1 g/lの活性炭を加え、混合物を約1時間攪拌する。この懸濁液を沪過し、イソプロパノールを添加することによりヒアルロン酸ナトリウムを沈降させ、イソプロパノールで洗い、最後に粉碎及び空気乾燥して「化粧品グレード」の製品を得る。

【0047】段階B

化粧品グレードのヒアルロン酸ナトリウムのセチルピリジニウム塩を2回連続的に沈降させた後、例えばフロリジルのようなケイ酸マグネシウムのカラムに不純物を吸着させることにより化粧品グレードのヒアルロン酸ナトリウムを精製する。フロリジル(Florisil)は、ウェストバージニア州、パークレー・スプリングス、Floridin社の登録商標である。

【0048】塩化セチルピリジニウム(CPC)沈降：段階Aで得られた化粧品グレードの材料を0.15M NaClに溶解させ、約0.25%の濃度のヒアルロン酸塩溶液を得る。0.15M NaCl中の10%CPC容量を約8容量の0.25%ヒアルロ

ン酸塩溶液に加える。セチルピリジニウム塩をデカンテーション及び遠心分離により分離し、0.15M NaClで洗った後、15%エタノールを含有する2MNaCl中に再溶解させ、約0.2%のヒアルロン酸塩溶液を得る。1容量のイソプロパノールを添加することにより、ヒアルロン酸をナトリウム塩として沈降させる。ペレットをイソプロパノールで洗い、上記のように0.15M NaClに再溶解させ、CPC沈降プロセスを繰り返す。次に、2度目のCPC沈降により得られたイソプロパノール沈降物を、フロリジル処理のために1M NaClに再溶解させる。

【0049】フロリジル吸着：ピロゲンを含まない1M NaCl中の約0.25%ヒアルロン酸ナトリウム溶液を30~60メッシュの活性化フロリジル、例えば溶液10 l当たり200gのフロリジルのカラムに通す。次に0.2mフィルタで沪過することにより溶液から細菌を除去する。沪過滅菌したイソプロパノール(1容量)によりヒアルロン酸ナトリウムを沈降させた後、無菌分析用グレードエタノールで洗う。最後に沈降物を無菌空気流により乾燥する。

【0050】この手順によるヒアルロン酸の収率は約60~70%である。

【0051】精製手順II及びIII

別の方法として、2つの異なる精製方法を用いて化粧品グレード及び臨床グレードのヒアルロン酸ナトリウムを製造することができる。これらの手順はヒアルロン酸ナトリウムを得るための好ましい手順である。手順IIによって低分子量の「化粧品グレード」のヒアルロン酸ナトリウムが製造され、手順IIIによって臨床使用に適した高純度高分子量の非炎症性ヒアルロン酸ナトリウムが製造される。

【0052】手順II

発酵が終了すると、発酵培養液を約90°Cに加熱し、次にpHを約5.0に調整し、培地を80°Cで40分間維持した。pHを7.0に調整し約20°Cに冷却することによってこのステップを終了する。この加熱プロセスでヒアルロン酸塩の分子量が約1~1.5×10⁶ドルトンまで減少する。

【0053】1.5倍容のエタノールを添加しヒアルロン酸ナトリウムを発酵混合物から沈澱させる。更に、沈澱物をエタノールで洗浄して微生物の大部分を除去する。

この粗材料を0.1%のパラヒドロキシ安息香酸メチルエステル含有の3%酢酸ナトリウム水溶液に再度溶解する。2~3 g/lのヒアルロン酸塩を含むように容量を調整する。1 g/lの活性炭と40 g/lのけい藻土タイプの沪過助剤例えばCelatom FW-1、Eagle-Picker Industries Inc.、Cincinnati、Ohio、とを溶液に添加し1時間以上攪拌する。次に沪過助剤ケーキで混合物を沪過する。1.5倍容のエタノールを添加してヒアルロン酸ナトリウムを沈澱させ、沈澱物を等容の3%酢酸ナトリウムに再度溶解する。この溶液を微孔コットンカートリッジで沪過し、次に1.5倍容のエタノールで処理する。沈澱した精製ヒアルロン酸ナトリウムを粉碎し最後に風乾して「化

「粧品グレード」の生成物を得る。

【0054】手順III

この手順では発酵終了直後に発酵培養液を1.5倍容のエタノールで処理する。沈殿したヒアルロン酸ナトリウムをエタノールで洗浄して微生物の大部分を除去し、次に0.1%のパラヒドロキシ安息香酸メチルエステル含有の0.15MのNaCl水溶液に再度溶解する。1~2g/lのヒアルロン酸塩が含まれるように容量を調整する。1kg/mgの活性炭と40kg/mgのCelatom FW-14とを溶液に添加し、混合物を1時間攪拌する。懸濁液を沪過助剤ケーキで沪過する。

【0055】塩化セチルピリジニウム(CPC) 沈殿

0.15MのNaCl中のCPCの10%溶液を透明なヒアルロン酸塩溶液に添加する。CPC溶液の添加量はヒアルロン酸の5倍の重量になるように計算する。沈殿したセチルピリジニウム塩を傾瀉及び遠心分離によって分離し、次に10容量%のエタノール含有の1MのNaClに再度溶解して約1~2g/lの溶液を調製する。1.5倍容のエタノールを添加してヒアルロン酸ナトリウムを沈殿させる。

【0056】沈殿物を0.15MのNaClに再度溶解し、前の段落に記載したCPC沈殿プロセスを繰り返す。第2のCPCプロセス後に得られたエタノール沈殿物を最終精製ステップで処理する。

【0057】フロリジル吸着

発熱物質を含まない無菌の1MのNaCl中の約0.1~0.15%のヒアルロン酸ナトリウム溶液を、30~60メッシュの活性フロリジルカラムに通す。例えば溶液1l当たり20g

粘度計: Cannon-Ubbelohde 希釀粘度計

サイズ100 (Cannon Instrument Co.)

溶液: 0.2M 塩化ナトリウム中の0.1%ヒアルロン酸ナトリウム

温度: 25°C ± 0.01

固有粘度の計算

η_{rel} - 純溶媒に対する溶液粘度の変化を示す相対粘度

【0064】

【数1】

$$\eta_{rel} = \frac{\text{試料 } \eta}{\text{対照 } \eta} = \frac{\text{試料 } \rho \times \text{試料 } t}{\text{対照 } \rho \times \text{対照 } t}$$

【0065】

ρ - 密度

t - 流動時間(秒)

η_{sp} - 比粘度。単位1に比較した粘度増加の測定値。

【0066】

【数2】

$$\eta_{sp} = \frac{\text{試料 } t - \text{対照 } t}{\text{対照 } t} = \eta_{rel} - 1$$

【0067】

η_{sp}/C - 減少粘度

C - 濃度 g/ml

のフロリジルを用いる。次に0.2μmフィルタで沪過して溶液を無菌にする。ヒアルロン酸ナトリウムをエタノール(1.5倍容)沈殿させ、分析グレードのエタノールで洗浄する。最後に沈殿物を無菌窒素流で乾燥する。

【0058】この手順によるヒアルロン酸ナトリウムの収率は約70~80%である。

【0059】産生ヒアルロン酸ナトリウムの特性

グレードIのヒアルロン酸ナトリウム

グレードIのヒアルロン酸ナトリウムは手順Iによる精製ステップAまたは手順IIの後に得られる「化粧品グレード」のヒアルロン酸ナトリウムである。その特性を以下に示す。

【0060】a. ヒアルロン酸ナトリウムの含量

87~91%。これは参照標準としてSigmaヒアルロン酸Type I, cat. #H1751を使用し、カルバゾール法、Bitter及びMuir、Anal. Biochem. 4, 330(1962)の変法で検定。

【0061】b. 平均分子量

約700,000~約1,500,000ドルトン。これは本質的にLaurent等、Biochem. Biophys. Acta 42, 476(1960)によって記載された極限粘度数から計算。固有粘度と分子量との代表的計算を以下に示す。

【0062】固有粘度及び分子量

ヒアルロン酸ナトリウム(NaHA)溶液の粘度を毛管粘度計によって測定した。サンプルの流動時間(t)を測定し純溶媒の流動時間(t)と比較した。

【0063】

(η) - 固有粘度(極限粘度数)

【0068】

【数3】

$$(\eta) = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/C$$

【0069】固有粘度(η)の決定

0.1%ヒアルロン酸ナトリウム溶液とこの溶液の2倍、3倍及び4倍希釀溶液との粘度を測定した。ヒアルロン酸ナトリウムの濃度はカルバゾール法で測定した。sp/CをCに対してプロットし、C=0まで直線状に外挿した。この線とY軸との交点から(η)を決定した。

【0070】分子量の決定

実験的に確定したMark-Houwink関係式

$$(\eta) = 0.0403 \cdot M^{0.775}$$

(式中のMは分子量をドルトンで示す)からヒアルロン酸ナトリウムの分子量を決定した。この関係式を使用して産生NaHAの種々のロットを分子量を決定した。関係式を表2に示す。

【0071】

【表2】

表 2

(η)、mg/g	分子量、ドルトン
800	350,000
1,200	590,000
1,600	860,000
2,000	1,145,000
2,500	1,600,000
3,200	2,100,000

【0072】c. グルクロン酸/N-アセチルグルコサミン(NAG)の比:1/1。Morgan and Elson法、Methods in Carbohydrate Chemistry 8, 89(1980)の変法によってNAGを検定した。

【0073】d. 含水量:10%±2%

e. タンパク質:0.1%未満。BradfordのCoomassie blue法(Anal.Biochem.72, 248(1976))で検定。

【0074】

f. ナトリウムイオン:5%±1%。炎光分析で検定。

【0075】g. 硫酸塩含量:0.05%未満。塩酸中で加水分解後にRoden等の濁り測定法、Methods Enzymol. 28, 73(1972)で測定。h. 核酸:0.5%未満。波長260mで1%溶液の吸光度の測定により検定。

【0076】i. 皮膚刺激の有無: この測定には1%溶液に対して以下の方法を用いる。(I) ウサギのDraize皮膚刺激テスト、J.H.Draize、「食品、薬物及び化粧品中の化学物質の安全性の査定Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics」、Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, Texas, pp.46-49(1959); (II) モルモットの遅延接觸過敏性テスト、Mag-nuson及びKligman、J.Invest.Dermatol.52, 268(1969)。

【0077】グレードIIのヒアルロン酸ナトリウム
グレードIIのヒアルロン酸ナトリウムは手順Iの段階Bによる精製又は手順IIIの精製後に得られる「臨床用グレード」のヒアルロン酸ナトリウムである。その特性を以下に示す。

【0078】

a. ヒアルロン酸ナトリウム含量: 88~92%。

【0079】b. 平均分子量: 7×10^6 ドルトンより大きい。通常は手順Iの段階Bで精製されたNaHAの分子量は約2~約 3.5×10^6 ドルトンの範囲であり手順IIIで精製されたNaHAの分子量は約2~約 4.4×10^6 ドルトンの

範囲である。これらの分子量範囲は前記のごとく極限粘度数から計算した。

【0080】c. グルクロン酸/N-アセチルグルコサミンの比:1/1。

【0081】d. 含水量:10%±2%。

【0082】e. タンパク質: 検出不能(0.01%未満)。

【0083】f. ナトリウムイオン: 5%±1%。

【0084】g. 硫酸塩含量: 検出不能(0.001%未満)。

【0085】h. 核酸: 検出不能(0.02%未満)。

【0086】i. 中性糖: 検出不能(0.2%未満)。

【0087】中性糖は加水分解後のサンプルで測定する。2Nトリフルオロ酢酸中で120°Cで1時間加水分解し次に減圧乾燥する。0.02M酢酸ナトリウムで予処理したシリカゲル薄層プレート(0.2mm)を用いて薄層クロマトグラフィーを行う。加水分解したサンプルと参照標準とをスポットし90:10のアセトン:水で展開する。硫酸で炭化して糖スポットを検出する。

【0088】j. 発熱性: 無。1%溶液をウサギに注射し当業者に公知の標準方法で発熱性を測定する。

【0089】k. 炎症活性の非存在: この特性はマウスを用いた感受性アッセイ法で測定する。この方法は炎症性物質の導入後の腹膜内への白血球特に多形核白血球及びマクロファージの遊走に基づく。これら細胞は超酸化物ラジカルを生じるよう炎症プロセスで感作される。遊走と感作とを以下の手順で検定する。マウス2~3匹ずつのがループに1mlのサンプルを腹膜内注射する。24時間後に各動物の腹膜を5mlのEarle培地で3回洗浄する。同がループのマウスの洗浄物を合わせる。細胞を1,500RPMで10分間沈降させ1mlに再度懸濁させて計数する。次にサンプルの容量を 4×10^6 細胞/mlになるよう調整し0.25mlずつのサンプルを0.5mlの2mg/mlのシトクロムCと勾配量の(0、2、10及び最終20mg)酢酸ミリスチン酸ホルボール(PMA)とによって90分間インキュベートする。PMAは酸化性「放出」系の活性化因子である。培地を1,500RPMで15分間遠心し、上清の吸光度を550nmで測定する。

【0090】腹膜細胞数の増加とPMAに反応しシトクロムCを減少させる最大能の増加との双方によって炎症が示される。従って、炎症指数は1匹のマウスから得られた白血球全部の活性(形成された超酸化物ラジカルのナノモル)として定義される。炎症指数が生理食塩水だけを注射したマウスに比較して有意に増加していないときはサンプルが非炎症性であると判定する。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
C 12 P 19/26 C 12 P 19/26
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:46)
(C 12 P 19/26
C 12 R 1:46)

(72) 発明者 ドヴ・カンナー
イスラエル国、レホヴオット、ゴードン
ストリート・21

(72) 発明者 モシユ・ランズバーグ
イスラエル国、ベタ・テイクヴァ、ザー
ル・ストリート・2